

## 血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

研究分担者 今井 耕輔 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
小児・周産期地域医療学講座 寄附講座准教授)

研究協力者 森尾友宏、満生紀子、高島健浩、葉姿汶、田中桂輔  
(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学)

### 研究要旨

血液免疫系細胞分化障害による疾患として、特に B リンパ球の終末分化である、免疫グロブリンクラススイッチ機構の異常症である高 IgM 症候群、原因病態が不明である IgA 欠損症、局所免疫にかかわる Th17 細胞の分化障害を伴う STAT1 異常症(慢性皮膚粘膜カンジダ症)、STAT3 異常症(高 IgE 症候群)を中心に解析を行い、早期の治療介入で予後の改善が見込めると考えられた。

### A. 研究の目的

原発性免疫不全症は、獲得免疫、自然免疫に関わる遺伝子の胚細胞性変異により、免疫系のみならず血液系などの細胞の分化障害あるいは機能障害により、易感染性だけでなく免疫調節異常を来す疾患の総称である。原発性免疫不全症患者の原因遺伝子を明らかにし、その病態を明らかにすることにより、その分子の免疫系・血液系などのヒト生体における働きが明らかになる。本研究では、特に B リンパ球の終末分化である、免疫グロブリンクラススイッチ機構の異常症である高 IgM 症候群、原因病態が不明である IgA 欠損症、局所免疫にかかわる Th17 細胞の分化障害を伴う STAT1 異常症(慢性皮膚粘膜カンジダ症)、STAT3 異常症(高 IgE 症候群)の原因遺伝子の探索および病態解析、さらに診断と治療に関する調査を行った。

### B. 研究方法

全国の医師から紹介を受け、専門医が遺伝子解析を含む病態解析を行い、その診断、治療に関するアドバイスを行う PIDJ (Primary immunodeficiency) ネットワークを通して紹介された患者の解析を通して、その臨床的特徴について収集し、10 カラー FACS を用いた表面抗原分析、T 細胞新生能を調べる TREC(T 細胞受容体遺伝子再構成産物)、KREC(免疫グロブリン鎖遺伝子再構成産物)の測定を行い、疾患の特徴を明らかにした。また、原因を同定するべく、かずさ DNA 研究所において候補遺伝子解析を行い、それにより原因が明らかにならなかった患者については、次世代シーケンサーを用いた Exome 解析を用い、原因遺伝子を明らかにすることとした。

なお、本研究は本学の倫理委員会により承認を得て各種研究倫理指針に準拠して行われた。研究に際しては、患者に対して

最小限の負担になるように配慮を行うと共に、研究内容、患者への利益・不利益、個人情報管理などを含め、担当施設、担当医を通じて十分な説明を行い、同意を得たものに関して検討した。患者氏名は情報管理者のもと、連結可能匿名化されて管理された。

### C. 研究結果

2013年には、本学に160例の原発性免疫不全症疑い患者が紹介された(図1)。原則的には全例に対して、10カラーFACSを用いた表面抗原分析解析を行い、TREC、KREC定量を行い、候補疾患の鑑別、病態の解明に役立てることとした。

今年 Angulo et al.(Science)、Lucas et al.(Nat Immunol)により高IgM症候群の新しい原因遺伝子として、*PIK3CD* 遺伝子(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta)の機能獲得変異が報告された。この疾患は、反復気道感染症、低グロブリン血症、高IgM血症、特異抗体産生不全を伴い、肝脾腫、リンパ節腫脹を呈する疾患である。共同研究先のネッケル小児病院(フランス、パリ)で解析を行った139例中、8例に同様の変異を認め、1例は本邦の症例であった。そこで、当科および防衛医科大学小児科との共同研究で行ったExome解析をした62例を検討したところ、4例の*PIK3CD* 遺伝子変異患者を同定した。また、当科86例、防衛医大69例の抗体産生不全症患者から、5例の*PIK3CD* 遺伝子変異患者を同定した。患者はいずれもリンパ組織腫脹を伴っていたが(表2)、発症年齢、随伴症状、さらに、IgG、IgAが正常あるいは高値の患者もあり(図2)、本疾患の多様性、および診断の困難さを示していた。今後は、自己免疫性リンパ増殖性疾患(ALPS)あるいはX連鎖性

リンパ増殖性疾患(XLP)を疑われた例の中に、*PIK3CD* 遺伝子異常患者が含まれていないかどうかについて、検討が必要である。そこで、FACSを用いた迅速診断法の確立を目指し、PI3KDの活性化に伴いリン酸化が亢進するとされるAKTについて、解析方法を確立した(図3)。これにより、スクリーニング検査として、有用であることが示唆された。*PIK3CD* 遺伝子異常を伴う患者の中には、悪性リンパ腫を発症する例、気管支拡張症を呈する例、日和見感染症を来す例があり、移植症例も5例に上ることが明らかになり、早期の治療介入で予後の改善が見込めると考えられた。

IgA欠損症は、原因不明の疾患であり、北欧では多くの患者が無症状であることが報告されているが、国内の症例の中には様々な合併症も併発している重症例も存在している。現在PIDJには29例の登録があり、当科および防衛医大でそのうち20例の患者について、解析を行っている。その中で、BTKのミスセンス変異を示す患者を一例発見し、その細胞免疫学的異常、およびB細胞受容体の配列解析を行い、現在投稿中である(Mitsuiki, et al)。もう一例は、TREC、sjKRECの低下を伴い、B細胞欠損とCD4+T細胞がCD45RO+のメモリー細胞に偏倚した症例であり、候補遺伝子検索の結果、*RAG1* 遺伝子異常であることが判明した(Kato et al, in submission)。

乳児期早期に自己免疫疾患を呈し、成人期にかかってB細胞欠損を呈し、低グロブリン血症を来した1患者の家系で、Exome解析の結果、LRBA遺伝子の複合ヘテロ変異を見出した。これは、本邦第1例であり、複合ヘテロ変異患者は世界で初めてである。この患者の病態解析を現在行っている。

STAT1 の機能獲得型変異により、Th17 細胞の分化異常などの免疫異常により、慢性皮膚粘膜カンジダ症を来することが最近報告された。当科に紹介された 15 例を解析したところ、重症度にばらつきがあり、軽微な表在性真菌感染症のみの症例から、獲得免疫系の異常も伴い日和見感染を来したり、造血障害や自己免疫疾患を呈する重症例もいることが明らかになった。そこで、臨床症状と T 細胞新生能、B 細胞新生能をもとに 4 段階の重症度分類を作成した。一部の重症例では骨髄移植などの造血幹細胞移植が必要であることも明らかになった(表 3)。

高 IgE 症候群 1 型は、STAT3 のドミナントネガティブ変異による、Th17 細胞の分化異常とアトピー性皮膚炎、および骨格異常を主な病態とする疾患である。当科には、これまで 26 例の高 IgE 症候群疑い患者が紹介され、そのうち STAT3 変異を認めたのは 10 例である(38.5%)。高 IgE 症候群の臨床的重症度を測る上で広く用いられている NIH スコアで見ると、STAT3 変異患者と変異を認めなかった患者とは、差がない。ただ、細分化すると、カンジダ感染症、肺炎の反復、乳歯脱落遅延、骨折が、重症アトピー性皮膚炎患者との鑑別点となりうることを明らかにした。CXCR3+CCR6-CD161+を用いた Th17 分画、および IgD/CD27 を用いたメモリー B 細胞分画をみることで、STAT3 異常症を見出すことが容易になることが明らかになった。

#### D. 考察

原発性免疫不全症の原因遺伝子の一つとして新たに報告された PI3K 鎖の機能獲得型変異が本邦でも 10 例で認められた。その中では、既報告にない新規変異も発見されたが、今後その機能解析が必要

である。また、PI3K 鎖の機能亢進が T 細胞の活性化誘導細胞死を過剰にし、そのため進行性のリンパ球減少を来す点は既報告で明らかにされているが、B 細胞における影響はあまり明らかではない。今後は、同定された患者検体を用いた解析を行っていきたい。治療についても半数の 5 例で造血幹細胞移植を行われていた。その中で早期の拒絶、2 次生着不全を末梢血幹細胞投与でしのいだ例、T 細胞の生着が遅れた例、移植 2 年後に突然死した例がみられた。移植適応の検討と同時に、移植方法についても今後検討が必要である。

IgA 欠損症、分類不能免疫不全症の原因遺伝子はほとんど明らかになっていないが、Exome 解析の進歩により少しずつ分かってきている。今回は既知の遺伝子異常の特殊な表現型が明らかになったが、今後は新規の原因遺伝子の同定、病態解析が必要となる。

STAT1 機能獲得型変異患者は臨床的には様々な重症度を示し、その治療の選択には難渋するが、TREC、KREC の結果を交えた重症度スコア化により、獲得免疫系症状が明らかである場合、造血幹細胞移植を積極的に検討することを提案したい。しかし、当科で施行した 2 例中、1 例については、致死的なマクロファージ活性化症候群により、拒絶を受け、多臓器不全により不幸な転帰をたどった。今後、本疾患に対する造血幹細胞移植法の改善を行っていきたい。

湿疹、皮膚膿瘍を来す高 IgE 症候群患者の中での、STAT3 異常患者の特徴について検討したが、真菌感染や肺炎、骨格系の異常が、特異度の高い症状として明らかになり、一部の免疫細胞の増減も特徴として考えられた。今後は NIH スコアを改変した形での診断基準の策定や治療法の最適化についての検討が必要である。

## E. 結論

今年度の検討で、多くの血液免疫分化異常症の病態、臨床像が明らかになった。これらの結果を受け、よりよい治療法の改善につなげ、患者のQOLの向上につなげていきたい。また、原因不明の患者はまだ多数存在する。次世代シーケンサーを組み合わせた解析を引き続き行い、その原因遺伝子の同定、病態の解明を行ってきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 今井耕輔.免疫グロブリンクラススイッチ異常症(高IgM症候群). 日本臨床 別冊 (2013)237-241
- 2) 高木 正稔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀.原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症. Rinsho Ketsueki. (2013) 54.357-64
- 3) Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. J Pediatr Hematol Oncol. (2013).35.482-5

### 2. 学会発表

- 1) 今井耕輔.新規高IgM症候群と病因探索について. 第116回日本小児科学会学術集会.分野別シンポジウム13-3.2013年4月21日,広島
- 2) 加藤 環,釜江智佳子,本間健一,池川健,横須賀とも子,和田泰三,谷内江昭宏,西田直徳,金兼弘和,満生紀子,小原 収,今井耕輔,森尾友宏,野々山恵章. IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KRECの結果からRAG1異常と

同定しえた1例. 第4回関東甲越免疫不全症研究会.2013年9月22日,東京

- 3) 満生紀子,今井耕輔, Xi YANG, 金兼弘和, 小阪嘉之, 高田英俊, 水谷修紀, 小原 収, 森尾友宏, BTK 変異をみとめたIgA 単独欠損の解析.第41回本臨床免疫学会総会.2013年11月27日, 下関
- 4) 加藤 環,釜江智佳子,満生紀子,小原明,林 正俊,野口恵美子,久保田健夫,本間健一,小原 収,今井耕輔,野々山恵章. 本邦におけるICF(Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies)症候群5例の検討. 第41回本臨床免疫学会総会. 2013年11月27日,下関
- 5) 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, 峯岸克行, 森尾友宏. 高IgE症候群患者の臨床的・免疫学的検討. 第7回日本免疫不全症研究会. 2014年1月25日, 福岡
- 6) 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, 森尾友宏. STAT1変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症12例の検討. 第4回関東甲越免疫不全症研究会. 2013年9月22日, 東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

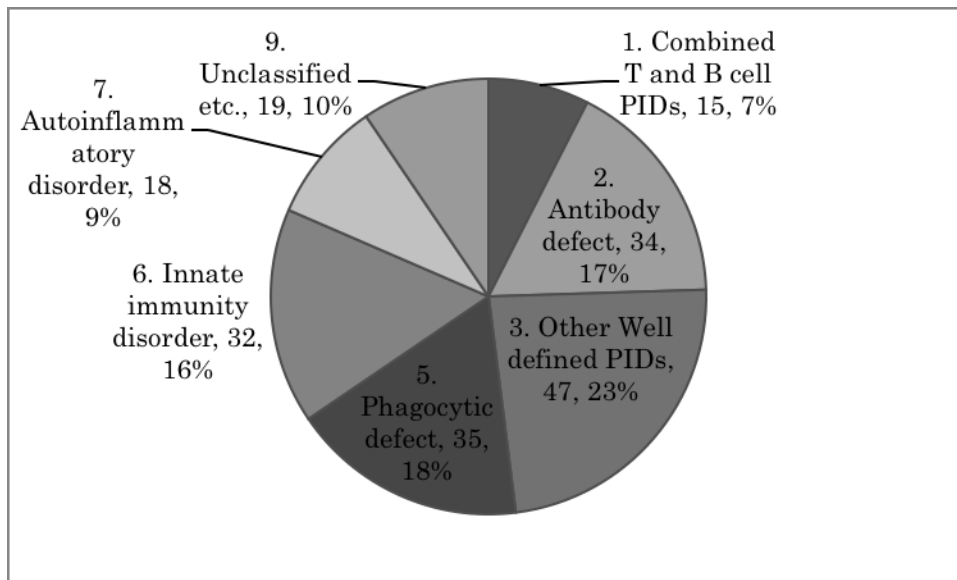


図 1: 2013 年の紹介患者 160 例の内訳

patients	P1	P2
<b>Year of birth</b>	1986	1990
<b>Age of onset</b>	2 yrs	5 months
<b>Main clinical features</b>	Recurrent LRT infections, liver damage, HMG, SMG, lymphadenopathy	Recurrent LRT infections bronchiectasis, chronic diarrhea, failure to thrive HMG, SMG
<b>Cytopenia</b>		Neutropenia
<b>Main biological features</b>	Lymphopenia 2 yrs IgM g/l (N) 4.25 (0.58-1.53) IgG g/l (N) 5.7 (3.35-8.96) IgA g/l (N) 0.65 (0.27-1.22) subclasses g/l IgG1 (N) 3.71 (>3) IgG2 (N) 1.5 (>0.30) IgG3 (N) 0.64 (>0.12) IgG4 (N) 0.3 (>0.04)	Lymphopenia 5 yrs 4.5 (0.54-1.55) <1.9 (5.49-11.54) 0.82 (0.41-1.57)
<b>Malignancies</b>	High grade DLBCL of biliary tract (EBV-, Bcl-6+; age 8yrs); High grade DLBCL of the colon (EBV-, Bcl-6-; stage IVB; age 19yrs)	Hodgkin lymphoma stage III
<b>treatment</b>	IVIg from 3yrs on Chemotherapy, rituximab	IVIg from 7 yrs on Chemotherapy, radiotherapy (11 yrs)
<b>outcome</b>	Died from large bowel perforation and bleeding post chemotherapy	In remission, alive

表1-1: *PIK3CD* 遺伝子異常に悪性リンパ腫を合併した 2 例 (Kracker et al, J Allergy and Clin Immunol. in press)

patients	P3	P4	P5	P6	P7 (sister of P2)	P8
Year of birth	2006	1991	1992	1998	1984	1999
Age of onset	2 yrs	8 yrs	5yrs	4 yrs	8 yrs	2 yrs
Main clinical features	Recurrent LRT infections, chronic diarrhea, SMG	Recurrent LRT infections , chronic diarrhea HMG, polyadenopathy macro crania	Recurrent LRT infections , chronic diarrhea, SMG, HMG, polyadenopathy	Recurrent LRT infections , Bronchiectasis	Recurrent LRT infections ,	Recurrent LRT infections, Bacterial pneumonia, chronic diarrhea SMG, HMG, polyadenopathy
Cytopenia	Thrombocytopenia		Neutropenia, AIHA, Thrombocytopenia		Neutropenia	Neutropenia
Immunological features	Lymphopenia		Lymphopenia	Lymphopenia	Lymphopenia	Lymphopenia
age	2yrs 9m	4 yrs	5 yrs	4 yrs	8 yrs	2 yrs 8m
IgM g/l (N)	3.9 (0.58-1.53)	7.23 (0.54-1.55)	1.18 (0.54-1.55)	2.65 (0.5-2.0)	2.28 (0.54-1.55)	1.57 (0.58-1.53)
IgG g/l (N)	0.12 (3.35-8.96)	4.77 (5.49-11.54)	3.98 (5.49-11.54)	9.7 (5.49-11.54)	8.98 (5.49-11.54)	1.30 (3.35-8.96)
IgA g/l (N)	<0.06 (0.27-1.22)	0.7 (0.41-1.57)	N.D. (0.41-1.57)	0.51 (0.4-2.0)	0.30 (0.41-1.57)	<0.1 (0.27-1.22)
subclasses g/l						
IgG1 (N)	0.08 (>3)	3.56 (>4)		8.88 (>4)		
IgG2 (N)	0.06 (>0.30)	1.61 (>0.40)		0.1 (>0.40)		
IgG3 (N)	0.02 (>0.12)	0.89 (>0.16)		0.11 (>0.16)		
IgG4 (N)	0.001 (0-2.10)	<0.075 (0-2.10)		<0.01 (>0.04)		
treatment	IVIgG from 3 yrs	HSCT at 8 yrs, IVIgG from 8 yrs	IVIgG from 6 years, Splenectomy, HSCT at 13 yrs	SCIgG from 4 yrs	IVIgG from 19 yrs	IVIgG from 3 yrs
outcome	alive	alive	dead (septic shock, multi organ failure, 14 yrs)	alive	alive	alive

表1-2: *PIK3CD* 遺伝子異常を呈した6例 (P5 が本邦の症例) (Kracker et al, J Allergy and Clin Immunol. in press)

case	Age at Diagnosis	Age at transplant	cytopenia	polyadenopathy	SMG,HMG	Infections	Others
1992ST003	5	13	pancytopenia	+	+	Recurrent LRT	splenectomy
1994MT001	2	17	lymphopenia, thrombocytopenia	+	+	Recurrent LRT	middle ear cholesteatoma,
1996IT003	6	16	lymphopenia, thrombocytopenia	+	+	Recurrent LRT	bronchiectasis, Nephrotic
1998FK002	3	11	lymphopenia	-	+	Recurrent LRT	hemorrhage
2004KH001	0.75	8	-	+	-	Recurrent LRT	macro crania, mild mental retardation
1989KG001	3	-	-	+	+	Recurrent LRT	EBV-BLPD
2000FU001	8	-	lymphopenia	+	-	Recurrent LRT	malakoplakia of the colon, Listeria
2001SY001	0.75	-	-	+	+	Recurrent LRT	hemorrhage
2003YT001	2	-	-	+	+	Recurrent LRT	MALT lymphoma s/o, E525A, mother
2005FK001	3	-	lymphopenia, thrombocytopenia	+	-	Recurrent LRT	-

表2: *PIK3CD* 遺伝子異常を呈した本邦の10例

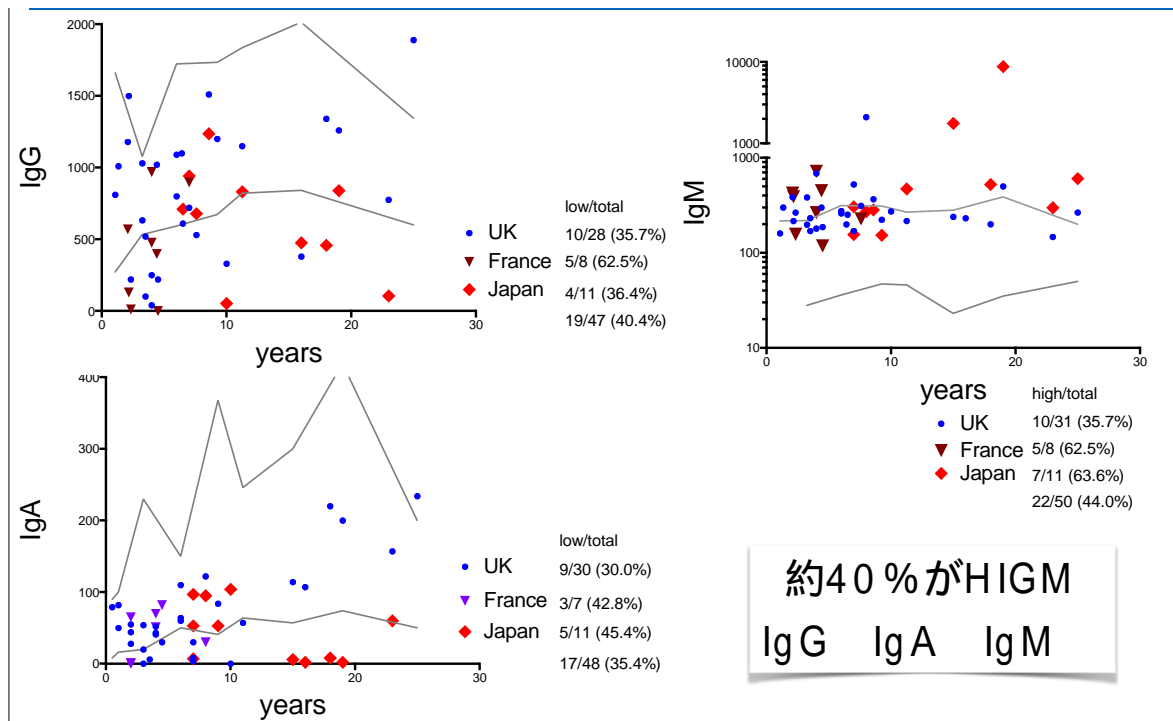


図2: *PIK3CD* 遺伝子異常患者における免疫グロブリン値

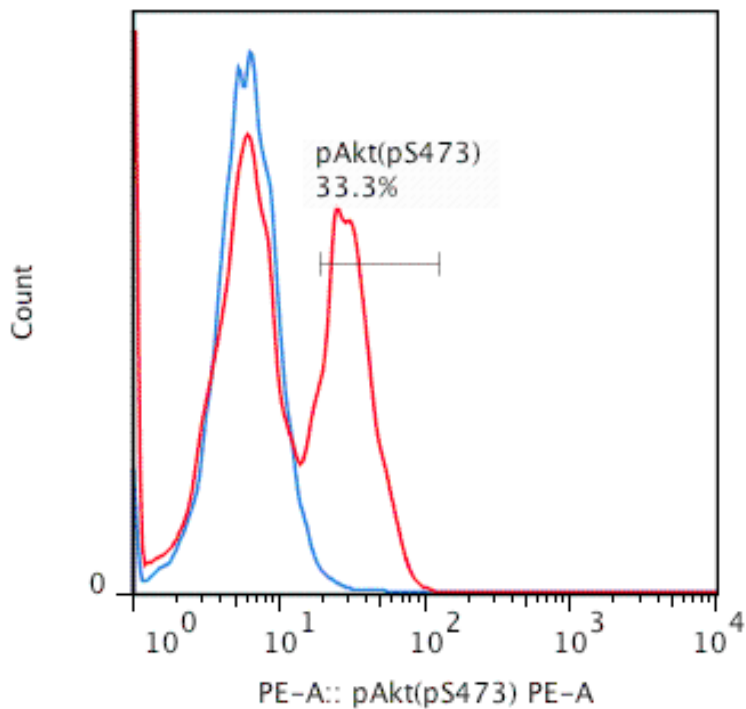


図3: PMA 刺激後の AKT のリン酸化の FACS 解析(S473)

## STAT1-GOF scoring system

Score	CMC	Viral Infection	Autoimmune disease, Lymphopenia, or Hypogammaglobulinemia	Other complication
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	+

Score	Molecular Defect	Coiled-coil domain	DNA-binding domain	Mean age
1	Innate immunity	4	-	15 (0~40)
2		1	2	22 (2~33)
3	Innate + acquired immunity	2	3	18( 0~43)
4	Innate + acquired immunity + visceral organ	3	-	15 (7~28)

STAT1-GOF Score	TREC/KREC Group			
	A群 TREC+/KREC+	B群 TREC+/KREC-	C群 TREC-/KREC+	D群 TREC-/KREC-
1	2			
2	2	1		
3	2		1	2
4		1	1	1

表3: STAT1 機能獲得型変異の臨床スコアと TREC, KREC との関係



# PIK3CD-GOFにおけるTREC/KREC

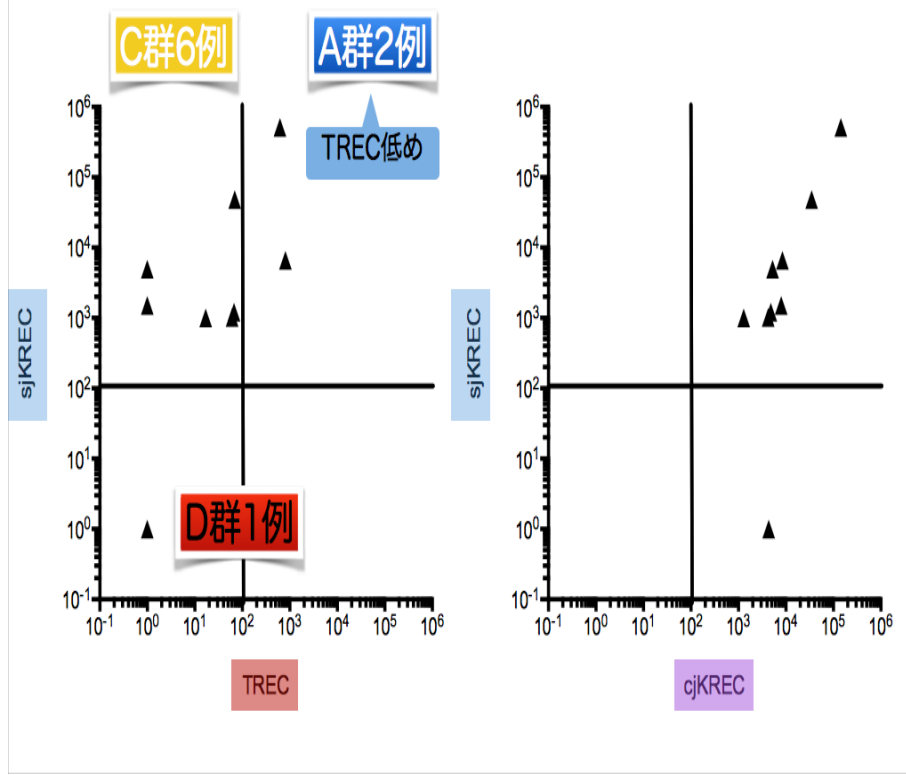


図 3: PIK3CD 遺伝子異常患者における TREC, sjKREC 値